



**University of  
Zurich**<sup>UZH</sup>

**Zurich Open Repository and  
Archive**

University of Zurich  
University Library  
Strickhofstrasse 39  
CH-8057 Zurich  
[www.zora.uzh.ch](http://www.zora.uzh.ch)

---

Year: 2007

---

## **Natrium-Phosphat-Kotransporter: Einblick in seinem Mechanismus**

Forster, I C

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich

ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-20326>

Journal Article

Originally published at:

Forster, I C (2007). Natrium-Phosphat-Kotransporter: Einblick in seinem Mechanismus. Nephro News, (3):51-53.

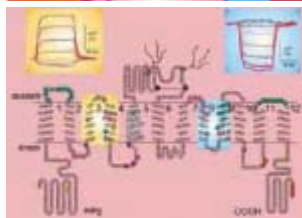
# Natrium-Phosphat-Kotransporter: Einblick in seinen Mechanismus

## Autor

[PhD Ian C. Forster](#)



[Bild vergrößern](#)



[Bild vergrößern](#)

## Einleitung

Anorganisches Phosphat (Pi) ist für verschiedene zelluläre Prozesse und die Mineralisierung der Knochen notwendig. Die Konzentration von Pi im Blutplasma ist unter anderem vom Ausmaß der Reabsorption des filtrierten Pi in den proximalen Tubuli der Niere abhängig. An diesem Reabsorptionsvorgang sind mindestens zwei Typen von Na-gekoppelten Transportern beteiligt, welche beide in der Bürstensaummembran von proximalen Tubuluszellen lokalisiert sind.

Beide Transportproteine, sowohl der elektrogene NaPi-IIa (SLC34A1) als auch der elektroneutrale NaPi-IIc (SLC34A3) (Abb. 1), gehören zu der SLC34-Gen-Familie. Die Transportproteine, die für den basolateralen Austritt von Pi verantwortlich sind, konnten noch nicht identifiziert werden. Ein anderes Mitglied dieser Gen-Familie, NaPi-IIb (SLC34A2), ist für die Absorption des mit der Nahrung aufgenommenen Pi im Darm verantwortlich. Zudem ist Na-Pi-IIb auch in anderen Organen, z. B. Lungen und Hoden, jedoch nicht in den Nieren exprimiert. Alle drei NaPi-II-Proteine transportieren bevorzugt divalentes Pi (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) entlang eines, durch die Na-K-Pumpe etablierten, elektrochemischen Gradienten von Na<sup>+</sup>-Ionen (Abb. 1). In den Nieren wird die Rate des Phosphattransports durch die Anzahl der NaPi-IIa/c Moleküle in der apikalen Membran bestimmt. Die Expression von NaPi-IIa und NaPi-IIc wird unter anderem durch hormonelle (z. B. PTH, Vit. D) und diätetische/metabolische Faktoren reguliert.

SLC34 Proteine sind mit verschiedenen Krankheiten assoziiert, welche eine defekte Pi-Homöostase aufweisen. So ist z. B. die "vererbte hypophosphatämische Rachitis mit Hypercalciurie" (HHRH) durch einen hohen Verlust von Pi charakterisiert. Als Ursache dafür wurden verschiedene Mutationen im SLC34A3-Gen beschrieben (Bergwitz C, Am J Hum Genet 78:179-192, 2006). Weitere Krankheiten mit defekter Pi-Homöostase sind pulmonale alveoläre Mikrolithiasis und testikuläre Mikrolithiasis, welchen Mutationen im SLC34A2-

Gen zugrunde liegen (Corut A, Am J Hum Genet 79: 650-656, 2006).

Bei "End Stage Renal Disease" (ESRD) ist die renale Rückresorption von Pi stark beeinflusst, was Hyperphosphatämie zur Konsequenz hat. Eine denkbare Behandlungstherapie wäre die Anwendung eines Inhibitors, welcher spezifisch auf NaPi-IIb im Darm wirkt. Da es bis jetzt jedoch keine klinisch akzeptable hemmende Substanz gibt, müssen ESRD- und Dialysepatienten mit Pi-reduzierter Ernährung und/oder täglicher Einnahme von Pi-Bindungsmedikamenten leben. Die obigen Bemerkungen unterstreichen die Wichtigkeit der Festlegung von Struktur-Funktions-Beziehungen der SLC34- Protein-Familie.

### Einsatz der Biophysik und der molekularen Biologie

Als Schlussfolgerung einer Vielfalt von experimentellen Beobachtungen und anschließender Datenanalyse konnten wir feststellen, dass die beiden Substrate (Na<sup>+</sup>-Ionen und Pi-Ionen) nacheinander an die NaPi-II- Moleküle binden, wobei jeder Bindungsschritt zu einer Konformationsänderung des Moleküls führt. Nach einer Konformationsänderung des vollgeladenen Transporters werden die Substrate in das Zytosol abgegeben. Ein vollständiger Transportzyklus wird durch die Reorientierung des unbesetzten Transporters abgeschlossen. Mittels einer Kombination aus biophysikalischen Messmethoden und molekularbiologischen Verfahren, wurden die verschiedenen kinetischen Schritte der Na/Pi-Kotransporter identifiziert. In diesem Artikel werde ich mich auf die Elektrogenizität der NaPi-IIa/b-Kotransporter und der entsprechenden Konformationsänderungen konzentrieren. Für diese Studien wurden Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem verwendet, was eine Überexprimierung der NaPi-II-Proteine in der Zellmembran erlaubt.

### Elektrogenizität der NaPi-IIa/b Proteine

Die Transportvorgänge von Typ-IIa und Typ-IIb-Na/Pi-Kotransportern sind elektrogen. Dies bedeutet, dass zusammen mit den Substraten auch Ladungen transportiert werden. Die intrazelluläre Elektronegativität dient als zusätzliche Kraft zum Antrieb des Transportprozesses. Wir konnten zeigen, dass ein striktes stoichiometrisches Verhältnis zwischen den kotransportierten Substraten und der netto Ladungsverschiebung besteht, nämlich: 3 Na<sup>+</sup>:1 HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>: 1 positive Ladung.

Wir haben diese Eigenschaft genutzt, um mittels elektrophysiologischer Messungen die Transportfunktion in Echtzeit zu studieren (siehe z. B.: Forster IC, Kidney Int 70:1548-1559, 2006; Forster IC, Prog Biophys Mol Biol 80: 69-108, 2002). Für solche Messungen wird die Membranspannung der Oozyten mittels einer sogenannten Spannungsklemme (engl. Voltage clamp) festgelegt. Gleichzeitig wird der Strom registriert, der mit der Transportgeschwindigkeit (z. B. der Anzahl Pi-Moleküle pro Sekunde) korreliert.

Neben dem Ladungstransport unter sogenannten "steady-state" Bedingungen (d. h. konstante Membranspannung und Substratkonzentration), sind auch schnelle (<1 ms) Änderungen der Membranströme bzw. kleine Ladungsbewegungen, sogenannte "Presteady-state relaxations", messbar. Diese sind ein Beweis dafür, dass Änderungen der Membranspannung Konformationsänderungen des Proteins induzieren können. Aufgrund der experimentellen Daten konnten wir folgern, dass diese Ströme durch eine Bindung resp. Freisetzung von Na<sup>+</sup>-Ionen an das NaPi-II-Molekül zustande kommen. Zusätzlich sind Konformationsänderungen als Antwort auf Membranpotentialänderungen verantwortlich für schnelle Ladungsbewegungen. Mithilfe elektrophysiologischer Messungen konnte der Transportmechanismus von Typ-II-Na/Pi-Kotransportern aufgeklärt werden, jedoch konnten die "funktionskritischen" Aminosäuren-Reste nicht identifiziert werden.

Ein wichtiger Wendepunkt in unserem Verständnis der Elektrogenizität von Na/Pi-II war die

überraschende Entdeckung, dass der Na/Pi-Kotransport via NaPi-IIc elektroneutral ist (Segawa H, J Biol Chem 277:19665-19672, 2002).

Die Aminosäuresequenz von NaPi-IIc ist zu einem grossen Teil identisch mit den elektrogenen Kotransportern NaPi-IIa/b. Diese Ähnlichkeit vereinfacht die Identifizierung von Bestandteilen des Proteins, welche funktionelle Bedeutungen haben könnten. Mittels eines Vergleichs der Aminosäuresequenz von NaPi-IIa und NaPi-IIc wurde eine Region des Proteins identifiziert, die für die unterschiedliche Eigenschaft (elektrogen vs. elektroneutral) verantwortlich ist. Dies konnte auch experimentell bestätigt werden (Bacconi A, Proc Natl Acad Sci U S A 102:12606-12611, 2005). Zusätzlich konnte für NaPi-IIc eine Stöchiometrie von 2 Na<sup>+</sup>:

1 HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> bestimmt werden. Die Elektroneutralität von NaPi-IIc ist daher eine direkte Folge des Kotransports von einem Na<sup>+</sup>-Ion weniger als bei NaPi-IIa. Anschließend konnten wir eine Aminosäure identifizieren, welche für die Koordination dieses Na<sup>+</sup>-Ions mitverantwortlich ist.

Was sind die möglichen Folgen der unterschiedlichen Stoichiometrie und Elektrogenizität von NaPi-IIa/b und NaPi-IIc? Auf der einen Seite weist NaPi-IIa/b eine 100-fach größere Konzentrationsfähigkeit gegenüber NaPi-IIc auf, obschon die Affinität für Pi bei beiden Proteinen ähnlich ist. Auf der anderen Seite ist die energetische Belastung der Zelle für NaPi-IIa/b größer, da die Zelle mit einem größeren Einfluss von Na<sup>+</sup>-Ionen rechnen muss. Ohne Kompensationsmechanismen kann dies zu einer zellulären Depolarisation und dadurch zu einer Abnahme der treibenden Kraft für den Transport führen. Ursprünglich wurde NaPi-IIa als der Hauptvermittler der Reabsorption von Pi im proximalen Tubulus betrachtet. Aufgrund von Mausstudien wurde NaPi-IIc als ein wachstumsbezogener Na/Pi-Kotransporter vorgeschlagen, da er vor der Entwöhnung stark exprimiert gefunden wurde. Die Befunde, dass bei HHRH-Patienten ein genetischer Defekt NaPi-IIc-Gen vorliegt, gaben Anlass dazu, die physiologische Rolle der zwei Kotransporter NaPi-IIa und NaPi-IIc im Zusammenhang mit der renalen Rückresorption von Pi beim Menschen nochmals zu überdenken.

Na/Pi-Kotransporter anders beleuchtet: Simultane Anwendung von elektrischen and fluorometrischen Messungen

"Voltage clamp fluorometry" (VCF) ist eine Messtechnik, mit welcher in Echtzeit elektrophysiologische und fluorometrische Messungen an einer einzelnen Zelle durchgeführt werden können. Die Idee ist einfach: Ein Cystein wird im Transportprotein an einer Stelle von funktioneller Bedeutung durch Punktmutation eingeführt (Abb. 2). Dies erlaubt es, ein fluoreszierendes Molekül (z. B. Rhodamine) kovalent an das Cystein zu binden.

Treten während des Transportzyklus Konformationsänderungen im Protein auf, kann in der Mikro-Umgebung des Fluorophors eine Änderung der ausgestrahlten Fluoreszenz stattfinden. Solche Änderungen können mit einer Zeitauflösung von weniger als 1 ms registriert werden, wodurch Hinweise auf Bewegungen innerhalb des Moleküls während des Transportzyklus erhalten werden können. Mit VCF haben wir starke Indizien dafür erhalten, dass 2 Na<sup>+</sup>-Ionen mit NaPi-IIb interagieren, bevor der Pi-Bindungsschritt stattfindet (Virkki LV, J Gen Physiol 127:539-555, 2006).

Ein weiterer Vorteil von VCF ist die Möglichkeit, nicht-elektrogene Konformationsänderungen entdecken zu können. In diesem Zusammenhang haben wir einen der ersten zwei Na<sup>+</sup>-Bindungsschritte als elektroneutral identifiziert. Dieser letztgenannte Schritt wird wahrscheinlich beim elektroneutralen NaPi-IIc-Transportvorgang beibehalten. Weiterhin wurde VCF verwendet, um die Konformationsänderungen während des ganzen Transportzyklus zu registrieren. Frühere Struktur-Funktions-Studien zeigten, dass der Transportweg durch NaPi-IIa durch zwei sogenannte "Reentrant Loops" (Protein-Domänen)

aufgebaut sein könnte (Abb. 2) (Forster IC, Prog Biophys Mol Biol 80:69-108, 2002). Eine mögliche Folgerung hiervon ist, dass sich diese Proteindomänen während des Na<sup>+</sup>- und Pi-Kotransportvorganges bewegen.

Diese Annahme wurde durch unsere neuesten VCF-Messungen unterstützt, in denen wir zeigen konnten, dass diese Proteindomänen komplementäre Bewegungen innerhalb ihrer Mikro-Umgebung während des Transportvorganges ausführen (Virkki L, J Biol Chem 281: 28837-28849, 2006).

#### Zusammenfassung

Mit biophysikalischen Messmethoden, welche Echtzeit-Messungen erlauben (Spannungsklemme und "Voltage Clamp Fluorometry"), konnten neue Einblicke in den Mechanismus der Membrantransport-Proteine der SLC34-Gen-Familie unter physiologischen Bedingungen gewonnen werden. In Zukunft werden solche Informationen nützlich sein, um kristallographische Strukturdaten der SLC34-Kotransporter zu ergänzen.

Ian C. Forster, PhD

Physiologisches Institut und Zentrum für integrative Humanphysiologie (ZIHP) der Universität Zürich